

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 464**

51 Int. Cl.:

G01N 21/27 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010 E 10725733 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2443438**

54 Título: **Procedimiento de detección por resonancia de plasmones superficiales y sistema de detección**

30 Prioridad:

19.06.2009 EP 09163292

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.08.2015

73 Titular/es:

**THE EUROPEAN UNION, REPRESENTED BY THE
EUROPEAN COMMISSION (100.0%)
Rue de la Loi, 200
1049 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**VALSESIA, ANDREA;
COLPO, PASCAL;
ROSSI, FRANÇOIS y
MARABELLI, FRANCO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 543 464 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección por resonancia de plasmones superficiales y sistema de detección.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento de detección por resonancia de plasmones superficiales (SPR) y a un sistema de detección por SPR. La invención se refiere, más particularmente, a un procedimiento de detección por SPR y a un sistema de detección por SPR adecuados para su utilización, entre otras, en pruebas químicas, bioquímicas, biológicas, biomédicas, farmacéuticas y físicas.

Antecedentes de la técnica

Existen muchos sensores conocidos que utilizan la excitación de plasmones superficiales, denominados sensores de resonancia de plasmones superficiales (SPR), para detectar cambios en el índice de refracción en una muestra de manera adyacente a una superficie de sensor. Tales sensores de SPR se utilizan, por ejemplo, para cuantificar concentraciones de sustancias en la investigación química, bioquímica, biológica, biomédica o farmacéutica, en diagnóstico clínico o alimentario o en mediciones ambientales (por ejemplo detección de gas o aguas residuales), etc. Muchos sensores de SPR pueden realizar inspecciones rápidas, paralelas y masivas, lo que hace que estos sensores también sean convenientes para cuantificar interacciones moleculares, en particular para estudiar la afinidad y la cinética de reacción en tiempo real entre dos o más moléculas que interactúan.

Los sensores de SPR se basan en el fenómeno ampliamente conocido de SPR, que implica una o más ondas electromagnéticas asociadas a la superficie que se propagan por una superficie de contacto entre un material metálico (normalmente, oro o plata) y un material dieléctrico. Cada onda electromagnética asociada a la superficie, que se debe a una oscilación colectiva de electrones libres por la superficie de contacto metal-dieléctrico, se propaga con su mayor intensidad en paralelo a esta superficie de contacto y decae exponencialmente a medida que se aleja de esta superficie de contacto.

De manera convencional, un sensor de SPR comprende una superficie de sensor que soporta plasmones superficiales, en la que puede excitarse ópticamente SPR. Es ampliamente conocido que la luz puede excitar la resonancia de plasmones superficiales en una superficie de contacto metal-dieléctrico si una componente paralela a la superficie de contacto de la luz incidente y una onda electromagnética asociada a la superficie de SPR presentan ambas frecuencias coincidentes y longitudes de onda coincidentes. En la condición de resonancia, la luz incidente se absorbe por la superficie de contacto metal-dieléctrico de manera que se acopla con la onda electromagnética asociada a la superficie. Es posible entonces observar esta absorción detectando, por ejemplo, una reducción en la intensidad de la luz que se transmite o refleja por la superficie de contacto metal-dieléctrico. Puesto que la condición de acoplamiento entre la luz y las ondas de plasmones superficiales es muy sensible a cambios en el índice de refracción del medio dieléctrico de manera próxima a la superficie de contacto metal-dieléctrico, los sensores de SPR aprovechan esta sensibilidad en la condición de acoplamiento de resonancia para detectar cambios en el índice de refracción de un medio dieléctrico midiendo la disminución de la intensidad de la luz reflejada desde la superficie de contacto metal-dieléctrico, mientras esta última se ilumina con un haz de luz de excitación de SPR.

La SPR encuentra aplicación particular en sistemas de biosensor que pueden detectar interacciones entre biomoléculas o moléculas bioquímicas, por ejemplo interacciones entre antígenos y anticuerpos, enzimas y sustancias básicas, glándulas endocrinas y receptores, ácidos nucleicos y ácidos nucleicos, etc. En particular, muchos sistemas de biosensor de SPR presentan receptores o ligandos unidos a su superficie de sensor de modo que detectan cambios en la condición de acoplamiento luz-SPR provocada por cambios en el índice de refracción en la superficie de sensor cuando moléculas bioquímicas o biomoléculas interactúan con (se unen a) esos receptores o ligandos. Tales sistemas de biosensor son adecuados para medir, por ejemplo, concentraciones de biomoléculas o moléculas bioquímicas en disoluciones, etc.

Actualmente existen una variedad de equipos de laboratorio basados en tal detección por SPR. La solicitud de patente US n.º 2009/021.727, por ejemplo, describe un procedimiento y dispositivo de detección por SPR para detectar cambios en el índice de refracción de un medio dieléctrico, en particular para detectar biomoléculas. Según el procedimiento de detección descrito en este documento, se dirige una luz polarizada magnética transversal hacia una capa metálica magnetizada para excitar SPR sobre esta capa metálica, en el que la luz se refleja por lo menos en parte por la capa metálica hacia un detector. El detector detecta entonces una característica de la luz reflejada y produce una señal que se analiza a continuación para determinar un valor absoluto de un índice de refracción, una magnitud y/o una indicación de aparición de un cambio en el índice de refracción de un medio dieléctrico adyacente a la capa metálica.

Otro sistema de biosensor de SPR para detectar moléculas bioquímicas se conoce a partir del documento US 2008/316.490. Este sistema comprende un sensor que presenta una película de detección metálica dispuesta sobre un sustrato de vidrio, en el que la película de detección metálica está cubierta con una estructura de rejilla metálica. El material metálico utilizado para este sensor comprende oro, plata o cobre. Se depositan micelas sobre la

superficie de sensor formada por la película de detección y la estructura de rejilla para permitir la reacción con biomoléculas. Se dispone entonces una muestra líquida que contiene biomoléculas sobre esta superficie, de modo que las biomoléculas de analito reaccionarán con estas micelas e inducirán de este modo un cambio en el índice de refracción en la superficie de sensor. Este cambio en el índice de refracción se detecta iluminando la superficie de sensor para excitar SPR sobre la misma y detectando un cambio en la intensidad de la luz reflejada.

El documento EP 1729110 da a conocer un biosensor óptico que presenta nanopartículas de metal noble. Se irradia luz desde una fuente de luz a las nanopartículas de metal noble a través de una fibra óptica y se introduce la luz reflejada en una o más unidades de detección ópticas a través de otra fibra óptica. Las unidades de detección óptica miden por separado la intensidad de la luz de entrada en una banda principal que incluye una longitud de onda de absorción máxima, así como en un par de bandas auxiliares que presentan respectivamente longitud de onda más larga y más corta. Las bandas auxiliares se encuentran en proximidad espectral a la banda principal y se utilizan para evaluar la cantidad de desplazamiento de la longitud de onda resonante de las nanopartículas de metal noble debido al cambio en el índice de refracción.

Sin embargo, los sistemas de detección por SPR mencionados anteriormente están sujetos a múltiples errores de detección y/o de medición de las propiedades de interés, tales como índices de refracción o cambios en el índice de refracción, etc. Tales errores pueden estar provocados por efectos externos tales como, por ejemplo, variaciones en la temperatura de una superficie de sensor y/o de un medio examinado, cambios o fluctuaciones en la intensidad de una luz medida y/o en la polarización medida de un haz de luz a lo largo de su trayectoria óptica, inestabilidades de fuentes de luz, señales de ruido que interfieren con una señal detectada, choques mecánicos sobre el sensor, etc. Es interesante observar que tales efectos ajenos pueden provocar cambios no deseados en la intensidad o polarización de un haz de luz que va a detectarse o medirse, lo que con frecuencia se denominan artefactos.

Además, los sistemas de detección basados en SPR mencionados anteriormente no están adaptados para detectar si se ha producido un artefacto, ni están adaptados para corregir tales artefactos.

El documento GB 2 197 065 describe un dispositivo de sensor óptico que utiliza resonancia de plasmones superficiales que comprende un cuerpo transparente recubierto con una película delgada de oro, estando ésta última recubierta adicionalmente, por ejemplo, con un anticuerpo. Se ilumina la superficie de la película con un haz de luz y se detecta la luz reflejada mediante una red de fotodiodos. En una forma de realización, están previstas dos fuentes de luz similares, utilizándose una para la detección. La otra fuente de luz se dirige a un lugar del sensor no recubierto para que sirva como canal de referencia para compensar efectos de unión no específica.

Problema técnico

Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento de detección por SPR o sistema de detección por SPR que pueda detectar y/o tener en cuenta la aparición de tales artefactos para una fiabilidad mejorada.

Esto se consigue mediante un procedimiento de detección por SPR según la reivindicación 1.

Descripción general de la invención

Para poder detectar la aparición de artefactos durante la detección por SPR, la presente invención propone, además de monitorizar la condición de resonancia de plasmones superficiales en relación con la muestra en investigación, monitorizar también la intensidad reflejada o transmitida de una luz de referencia que no excita SPR.

De hecho, la monitorización de la intensidad de luz reflejada o transmitida en condiciones distintas a SPR puede utilizarse ventajosamente para comprobar fluctuaciones o derivas que no se ven afectadas por el fenómeno de interés, es decir el desplazamiento en SPR debido a variaciones en el índice de refracción en la superficie de sensor. Los presentes inventores han observado, de hecho, que las fluctuaciones de tal luz de referencia transmitida o reflejada están provocadas por fenómenos ajenos, por ejemplo variaciones en la temperatura o inestabilidades de la fuente de luz.

Según el presente procedimiento, se monitoriza una condición de resonancia iluminando la superficie de sensor con por lo menos un haz de luz de prueba para excitar SPR, y se detecta y preferentemente se mide la luz de prueba reflejada o transmitida. Se entenderá que, para excitar SPR en la superficie de sensor, dicho por lo menos un haz de luz de prueba presenta una o más frecuencias que coinciden con una o más frecuencias de ondas electromagnéticas asociadas a la superficie en la superficie de sensor. Simultánea o alternativamente, se ilumina la superficie de sensor mediante por lo menos un haz de luz de referencia en condiciones seleccionadas para no excitar la resonancia de plasmones superficiales en dicha superficie de sensor, y se mide la intensidad reflejada o transmitida. Según un aspecto importante de la invención, la intensidad reflejada o transmitida detectada o medida del haz de luz de referencia se tiene en cuenta en la determinación de una propiedad de la luz, por ejemplo la intensidad, de dicho por lo menos un haz de luz de prueba según se transmite o refleja por la superficie de sensor.

Tener en cuenta la intensidad medida de la luz de referencia reflejada/transmitida al realizar la SPR permite determinar la aparición de un artefacto e incluso, lo que es más interesante, una corrección sistemática de los valores de prueba medidos. Por consiguiente, el haz de luz de referencia detectado puede tomarse como base para filtrar o corregir el haz de luz de prueba detectado/medido.

5 Preferentemente, el haz de luz de referencia abarca una banda espectral cuyos límites espectrales se encuentran en una posición espectral alejada por lo menos el doble de la anchura a media altura de la resonancia de plasmones superficiales del pico de resonancia de plasmones superficiales (más próximo) (considerando el centro del pico). Tal haz de luz de referencia (o respectivamente la banda monitorizada correspondiente) preferentemente presenta una anchura espectral estrecha, por ejemplo del orden de 100 nm o menos.

15 La presente invención puede implementarse basándose en cualquier clase de tecnología de detección por SPR, por ejemplo basándose en el enfoque de Kretschmann convencional o en la utilización más reciente de nanorrejillas metálicas periódicas como capa de detección de superficie, u otra configuración de capa de detección de superficie adecuada que soporte SPR localizada y/o deslocalizada, en la medida en que la tecnología seleccionada permita monitorizar la reflectividad/transmisividad de un haz de luz de referencia que no motiva SPR en la superficie de sensor.

20 Puede observarse que, puesto que las condiciones de resonancia vienen determinadas esencialmente por el diseño del sensor, la iluminación en condiciones de excitación o no excitación de SPR se determina mediante una selección apropiada del ángulo de incidencia y la longitud de onda (o respectivamente el número de ondas). Basta con variar de manera apropiada uno del ángulo de incidencia y la longitud de onda para pasar de una condición de iluminación que motiva resonancia a una iluminación que no motiva resonancia. No obstante, podrían variarse ambos.

25 La monitorización de la señal de referencia puede realizarse en cualquier momento apropiado. De manera ideal, se lleva a cabo una medición de la luz de referencia para cada medición de prueba, ya sea simultáneamente o de manera alterna. En este último caso, la medición de prueba y de referencia deben ser preferentemente muy cortas (del orden de uno o unos pocos milisegundos cada una, separadas por un periodo de transición muy breve, también de milisegundos).

30 Preferentemente, el presente procedimiento implica medir una o más intensidades espectrales, es decir intensidades que corresponden a frecuencias específicas, y/o determinar cambios en una o más intensidades espectrales de por lo menos un haz de luz de prueba o de por lo menos un haz de luz de referencia según se transmite o refleja por la superficie de sensor. Más preferentemente, el procedimiento implica determinar un cambio máximo en las intensidades espectrales medidas para detectar una aparición de excitación de SPR en la superficie de sensor.

35 Preferentemente, el presente procedimiento propone determinar un cambio máximo en las intensidades espectrales medidas para determinar un valor indicativo de la magnitud de un cambio en la condición de acoplamiento luz-SPR en la superficie de sensor.

40 La propiedad medida de la luz de por lo menos un haz de luz de prueba puede ser una intensidad medida, en particular una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida, o un cambio medido en la intensidad, en particular un cambio medido en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, de dicho por lo menos un haz de luz de prueba. Puede observarse que un cambio en una intensidad promediada en tiempo y/o en frecuencia medida de por lo menos un haz de luz de prueba puede ser indicativo de un cambio en la intensidad promediada en tiempo y/o en frecuencia medido o de un cambio medido en una intensidad promediada en tiempo y/o en frecuencia y viceversa. Asimismo, una propiedad medida de la luz también puede ser indicativa de una polarización de dicho por lo menos un haz de luz de prueba según se transmite o refleja por la superficie de sensor.

50 Puede observarse además que una intensidad promedio ponderada en tiempo o en frecuencia de un haz de luz de referencia y/o de un haz de luz de prueba puede ser indicativa de una intensidad promedio ponderada en tiempo y/o de una intensidad promedio ponderada en frecuencia. Una intensidad promediada ponderada en tiempo monitorizada o medida es preferentemente indicativa de una intensidad monitorizada o medida promediada a lo largo de uno o más intervalos de tiempo, preferentemente en el rango de los milisegundos. Sin embargo, una intensidad promedio ponderada en frecuencia monitorizada o medida de un haz de luz puede ser indicativa de una intensidad espectral promedio, es decir de un valor medio de intensidades espectrales, que se pondera mediante las frecuencias que componen el espectro del haz de luz. En particular, cuando un haz de luz de referencia o de prueba presenta una banda espectral continua, una intensidad promedio ponderada en frecuencia medida puede ser indicativa de una integración, en particular de una integración numérica, de las intensidades medidas a lo largo del espectro del haz de luz.

60

La intensidad monitorizada del haz de luz de referencia y/o una intensidad medida del haz de luz de prueba pueden ser indicativas de una reflectividad, reflectancia, transmisividad, transmitancia, absorbancia, etc., medida del haz de luz correspondiente.

65

- 5 En una forma de realización, el presente procedimiento propone procesar, en particular filtrar, una propiedad medida de la luz de por lo menos un haz de luz de prueba o una medición de la misma utilizando un valor de deriva determinado indicativo de una desviación de la intensidad monitorizada del haz de luz de referencia según se transmite o refleja por la superficie de sensor, con el fin de descartar o validar un valor de prueba medido. Hay disponibles diversos enfoques conocidos para realizar tal filtrado. Una posibilidad es descartar valores de prueba medidos cuando el valor de deriva correspondiente supera un umbral predeterminado. Alternativamente, es posible considerar que, si un valor de prueba de intensidad medido es por lo menos tres veces el valor de ruido (es decir, el valor de intensidad de referencia), entonces el valor de prueba de intensidad medido se considera correcto.
- 10 En otra forma de realización puede utilizarse un valor de deriva para corregir una intensidad medida de haz de prueba reflejado/transmitido, en particular una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida, o un cambio en una intensidad medida, en particular un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida de dicho por lo menos un haz de luz de prueba. Por ejemplo, una intensidad medida de un haz de luz de prueba puede corregirse realizando cálculos, tales como combinaciones lineales, en particular restas,
- 15 entre esta intensidad medida o esta intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida y el valor de deriva.
- Como saben los expertos en la materia, en procedimientos de SPR clásicos, el modo de resonancia sólo está deslocalizado y existe para un conjunto de combinaciones dadas entre el ángulo de incidencia y la longitud de onda. Por consiguiente, la iluminación de dicha superficie de sensor con un haz de luz de referencia en condiciones seleccionadas para no excitar SPR puede llevarse a cabo operando con un ángulo que no excite SPR, es decir operando a una distancia angular suficientemente alejada del ángulo de resonancia.
- 20 La SPR moderna emplea nanorrejillas en las que existen modos deslocalizados y modos localizados. Los modos deslocalizados se comportan de la misma manera que el caso descrito anteriormente, por lo que, a una longitud de onda fija, es posible encontrar algunos "intervalos angulares" en los que no se excita SPR. Los modos localizados, sin embargo, son sin dispersión, lo que significa que existen a una longitud de onda fija para todos los ángulos. Por consiguiente, cuando se opera con sensores de SPR basados en nanorrejillas, normalmente debe pasarse de condiciones de excitación o de no excitación de SPR variando la longitud de onda. Desde el punto de vista práctico,
- 25 también es mucho más fácil ya que evita cualquier desplazamiento de haces de luz.
- Según otro aspecto de la presente invención, se propone un sistema de detección por SPR según la reivindicación 14, que es adecuado para realizar el procedimiento según la reivindicación 14.
- 35 Preferentemente, el fotosensor está adaptado para medir una intensidad, en particular una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, o un cambio en la intensidad, en particular un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, de por lo menos un haz de luz de prueba según se transmite o refleja por la superficie de sensor. Más particularmente, el fotosensor puede estar adaptado para monitorizar una intensidad, preferentemente una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, de dicho por lo
- 40 menos un haz de luz de referencia según se refleja o transmite por la superficie de sensor, y configurado para utilizar un valor de deriva para corregir la intensidad medida, la intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida o un cambio en la misma.
- Preferentemente, la superficie de sensor comprende una capa de detección diseñada como una nanorrejilla metálica periódica, siendo el metal, por ejemplo, oro, plata u otros metales nobles utilizados en la técnica. La superficie de sensor está soportada, ventajosamente, sobre un sustrato transparente que transmite los haces de luz de prueba y de referencia, lo que permite una detección en modo de reflexión. El sustrato puede estar compuesto por vidrio o polímero transparente a la luz.
- 45 Para aplicaciones de biodetección, restos de selección como diana que presentan especificidad de unión por analitos deseados pueden fijarse normalmente sobre la superficie de sensor. Los restos de selección como diana se organizan preferentemente como una microrred y pueden ser de diferentes clases. Los restos de selección como diana pueden fijarse a la superficie de sensor a través de una capa de hidrogel apropiada, por ejemplo una capa de PEG.
- 50 En una forma de realización preferida, el sistema de detección comprende un sensor con una superficie de sensor con una nanorrejilla de oro periódica y una microrred de restos de selección como diana fijados a la misma. El sistema está configurado para operar en modo de reflexión y comprende un detector de CCD así como un LED para emitir el haz de luz de referencia y por lo menos un LED, preferentemente dos, para monitorizar las posiciones de acoplamiento de resonancia respectivas. Ésta es una forma de realización particularmente ventajosa que puede construirse como aparato de SPR de tamaño bolsillo lo que permite la medición en modo multiplexado de varias especies bioquímicas con una alta fiabilidad y precisión, sin riesgos de errores en las mediciones debido a artefactos.
- 60 Estas y otras formas de forma de realización preferidas del presente procedimiento y sistema se mencionan en las reivindicaciones dependientes.
- 65

Breve descripción de los dibujos

Detalles y ventajas adicionales de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada de varias formas de realización no limitativas haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

5 la figura 1: es una gráfica que muestra un conjunto de curvas con resolución en frecuencia indicativas de las intensidades de un haz de luz de prueba y de un haz de luz de referencia que se han medido para diferentes valores de índice de refracción de un medio en contacto con la superficie de sensor;

10 la figura 2: es una gráfica que muestra un conjunto de valores de deriva indicativos de variaciones en las intensidades monitorizadas de un haz de luz de referencia, que se han obtenido para diferentes valores de índice de refracción de un medio adyacente a la superficie de sensor según la presente invención;

15 la figura 3: es una gráfica que presenta conjuntos de valores promediados en frecuencia corregidos y no corregidos de intensidades medidas de un haz de luz de prueba, que se han obtenido para diferentes valores de índice de refracción de un medio adyacente a la superficie de sensor;

la figura 4: es una ilustración esquemática de un sistema de detección por SPR preferido;

20 la figura 5: es una vista en perspectiva esquemática de una estructura de sensor preferida para su utilización en aplicaciones de biodetección.

Descripción de formas de realización preferidas

25 La presente invención proporciona un procedimiento de detección por SPR fiable, que tiene en cuenta la aparición de artefactos, es decir eventos que son ajenos al fenómeno en observación y que afectan a la precisión de las mediciones.

30 Tal como se conoce bien, los procedimientos de análisis por SPR convencionales se basan en cambios en la reflectividad óptica de una película delgada de metal (normalmente, oro) cuando se pone en contacto con una muestra líquida (o posiblemente gaseosa) de interés. Normalmente, un procedimiento de este tipo implica excitar los plasmones superficiales en la superficie de contacto metal/muestra por medio de un haz de luz de prueba y detectar la luz reflejada (o transmitida), dependiendo la intensidad de la luz reflejada del acoplamiento del haz de luz de prueba incidente y de las ondas de plasmones superficiales que se propagan.

35 En una condición de resonancia, es decir cuando se obtiene un acoplamiento de resonancia entre la luz de prueba incidente y las ondas de plasmones superficiales, se observa una fuerte atenuación en la intensidad de la luz de prueba reflejada. Esta condición de resonancia es muy sensible al índice de refracción de la muestra y tradicionalmente se hace un seguimiento de la misma variando las condiciones de iluminación. En configuraciones de laboratorio típicas, la resonancia se monitoriza siguiendo la variación en la intensidad de la luz frente a la longitud de onda o el ángulo incidente. En otros sistemas de SPR, más prácticos, se realiza un seguimiento del desplazamiento de la condición de resonancia siguiendo la variación en la intensidad reflejada bajo un haz de luz incidente puntual generado, por ejemplo, por un LED con ancho de banda estrecho o un láser.

45 El presente procedimiento se basa en la técnica de SPR y proporciona una manera de tener en cuenta artefactos que aparecen durante las mediciones. Esto se consigue monitorizando la reflectancia (transmitancia) de la superficie de sensor que soporta SPR en condiciones que no excitan la resonancia para detectar así una deriva o un cambio en la intensidad reflejada (que resulta de un haz de luz de referencia incidente) que no se debe a acoplamiento de resonancia entre el haz de luz incidente y las ondas de plasmones superficiales. Por tanto, el procedimiento de la invención utiliza una propiedad óptica de la superficie que, intencionadamente, no está relacionada con ninguna resonancia de plasmones soportada por la superficie.

50 Tal detección de artefacto es aplicable con cualquier técnica de detección por SPR, en la que una intensidad de señal reflejada o transmitida puede medirse en condiciones de iluminación seleccionadas para no excitar SPR.

55 La siguiente descripción del presente procedimiento y sistema con referencia a las figuras se refiere a una forma de realización preferida con una estructura de sensor preferida que presenta una superficie de sensor que soporta SPR localizada y deslocalizada y adaptada para biodetección así como a un sistema de detección configurado para operar en modo de reflexión y con un ángulo de incidencia fijo.

60 El presente procedimiento aplicado a un biosensor de este tipo puede implementarse de la siguiente manera. Se pone una muestra que va a analizarse en contacto con la superficie de un sensor adecuado para soportar SPR. Una forma de realización preferida de un sensor de este tipo se describirá en más detalle a continuación con referencia a las figuras 4 y 5, sin embargo puede observarse que preferentemente presenta una superficie de sensor que comprende una nanorrejilla metálica periódica de un metal noble (en este caso, oro) con el fin de soportar SPR

65

localizada y deslocalizada. Las propiedades geométricas y físicas de esta nanorrejilla determinan la respuesta óptica del sensor.

5 Tras poner la superficie de sensor en contacto con una muestra que va a analizarse, se ilumina la superficie de sensor mediante un haz de luz de prueba que presenta una frecuencia y un ángulo incidente que se sabe que pueden excitar SPR en la superficie de sensor. Puede observarse que el haz de luz de prueba que ilumina la superficie de sensor puede estar configurado de una manera que se sabe *per se* que presenta una polarización dada. Para excitar SPR, el haz de luz de prueba presenta una o más frecuencias que coinciden con una o más frecuencias admitidas de las ondas electromagnéticas asociadas a la superficie en la superficie de sensor.
10 Preferentemente, el sensor está diseñado de modo que las frecuencias admitidas de SPR corresponden normalmente al espectro de luz visible/infrarrojo cercano. Dado que el haz de luz de prueba excita SPR, por lo menos parte del haz de luz de prueba se absorbe en la superficie de sensor, dependiendo la magnitud de absorción de la frecuencia de la luz incidente en la superficie de sensor. La luz del haz de luz de prueba que no se ha absorbido en la superficie de sensor se refleja o transmite entonces por la superficie de sensor.

15 Entonces se detecta (mide) una propiedad de la luz del haz de luz de prueba reflejado, preferentemente su intensidad, y se determina un valor real de la propiedad medida de la luz, que es representativo del nivel de excitación de los plasmones superficiales y permite valorar una condición de resonancia o el desplazamiento de la condición de resonancia establecida con respecto a datos calibrados o previamente almacenados/adquiridos. Tal como se sabe, una condición de resonancia normalmente conduce a una disminución de la intensidad medida de la luz reflejada del haz de luz de prueba debido a la absorción de la luz en la superficie de sensor, y una modificación en el índice de refracción de la muestra de manera adyacente a la superficie de sensor provoca un desplazamiento de la condición de resonancia.

25 Durante tal medición de la intensidad reflejada de una luz de prueba, la medición puede verse afectada por efectos parásitos ajenos, tales como fluctuaciones en la temperatura o fuente de luz, variaciones en la sensibilidad del detector o modificaciones en la configuración mecánica, que alteran la respuesta global del sistema de detección. Tales artefactos provocan por tanto una desviación o deriva de la intensidad medida de la luz de prueba reflejada, en comparación con el valor medido que se habría obtenido sin artefacto y, por tanto, se interpretan erróneamente como un cambio en el índice de refracción.
30

Se apreciará que, para poder comprobar la aparición de un artefacto de este tipo y/o corregir el valor de intensidad determinado, se propone iluminar la superficie de sensor mediante un haz de luz de referencia en condiciones que se seleccionan para no excitar SPR en la superficie de sensor. Por consiguiente, el haz de luz de referencia presenta una o más frecuencias que no coinciden con ninguna frecuencia admitida de las ondas electromagnéticas asociadas a la superficie en la superficie de sensor (siendo el ángulo de incidencia fijo en esta variante). En otras palabras, el haz de luz de referencia presenta una o más frecuencias que no se encuentran en una banda espectral que provoca una condición de resonancia en la superficie de sensor. La monitorización de la intensidad de la luz de referencia reflejada especularmente (es decir, de los haces reflejados que presentan longitudes de onda/bandas espectrales que no excitan SPR, por tanto a una distancia espectral apropiada con respecto a la resonancia) a lo largo del tiempo permite determinar una variación en la intensidad de la luz de referencia reflejada que no se debe a SPR y, por tanto, indica un cambio en el sistema de sensor que no se debe al fenómeno en observación.
35 40

45 Tal como se explicará en más detalle a continuación, el haz de luz de referencia puede aprovecharse de manera sencilla para detectar una deriva de la medición debida a un artefacto (por tanto, con fines de filtrado), aunque también puede tenerse en cuenta para corregir los valores de intensidad de luz de prueba reflejada, proporcionando una especie de corrección de ruido.

50 De hecho, puede monitorizarse la intensidad del haz de luz de referencia reflejado o transmitido y, a continuación, se determina un valor de deriva indicativo de una desviación de la intensidad monitorizada con respecto a datos de referencia (una medición previa u otros datos almacenados o calibrados). Se entenderá que, en este caso, cualquier desviación de la intensidad monitorizada con respecto a una intensidad previamente monitorizada es indicativa de una variación en el tiempo de la intensidad de referencia monitorizada debida a efectos parásitos.

55 La propiedad medida de la luz del haz de luz de prueba puede procesarse utilizando el valor de deriva. Por consiguiente, la intensidad medida del haz de luz de prueba reflejado o transmitido se corrige utilizando el valor de deriva, por ejemplo tomando la diferencia entre la intensidad medida y el valor de deriva 32 indicativo de una variación en la intensidad monitorizada del haz de luz de referencia. Por tanto, se entenderá que un artefacto en la intensidad del haz de luz de prueba medida, que ha sido provocado por un efecto externo que también ha provocado de manera similar una variación en la intensidad monitorizada del haz de luz de referencia, puede corregirse por tanto restando el valor de deriva de la intensidad medida del haz de luz de prueba. Las intensidades medidas corregidas del haz de luz de prueba pueden entonces procesarse adicionalmente, almacenarse o presentarse visualmente.
60

65 Con vistas a una ejemplificación y para entender mejor el principio de funcionamiento del presente procedimiento, se describirá el procedimiento con respecto a las figuras 1 a 3, que se obtuvieron utilizando un chip de sensor con una

superficie de sensor que comprende una nanorrejilla de oro periódica. El sensor se investigó en modo de reflexión por medio de un haz blanco colimado emitido por una fuente de luz de tungsteno con un ángulo fijo. La luz reflejada se detectó por medio de un detector de CCD con resolución espectral (400-1050 nm). Tal como conocen los expertos en la materia, en una configuración de este tipo los parámetros de la nanorrejilla y el ángulo de incidencia determinan, de manera unívoca, la respuesta óptica del sistema y, por tanto, la posición espectral de las resonancias. Estos picos de resonancia son resultado del desplazamiento en los modos de resonancia localizada y deslocalizada.

Se adquirieron los espectros utilizando las siguientes muestras: una primera muestra de disolución de tampón fosfato puro (PBS, índice de refracción $n = 1,334$), y después varias muestras de PBS que contenían concentraciones predeterminadas de glicerol (en realidad desde el 0,1% hasta el 25%), que proporcionan una variación conocida en el índice de refracción en la superficie de sensor. Tras investigar cada muestra se representó gráficamente la gráfica de la figura 1, indicando el eje vertical una denominada señal calculada como la razón de la intensidad reflejada de las muestras con concentraciones variables de glicerol con respecto a la intensidad reflejada de la muestra de PBS puro, mientras que el eje horizontal muestra la longitud de onda.

Para la muestra con PBS, la señal debe ser de manera ideal del 100%. Tal como puede observarse en la figura 1, en esta configuración la señal es una función de la concentración creciente de glicerol, observándose tres picos de resonancia: un pico positivo centrado en 760 nm, un pico negativo centrado en 820 nm y un pico positivo ancho centrado en 900 nm. Estos picos resultan de la capacidad de resonancia localizada y deslocalizada del sensor.

En el lado derecho de la gráfica, las intensidades de los picos (o respectivamente sus áreas) aumentan con la concentración de glicerol. En el lado derecho, la parte del espectro de desde 450 nm hasta 700 nm se mantiene sustancialmente sin cambios, pero, lo que es más importante, no revela ninguna condición de resonancia debida a la configuración específica que se ha seleccionado (propiedades de la rejilla, ángulo de trabajo y longitud de onda).

Así, la variación en el índice de refracción inducida por las muestras en contacto con la superficie de sensor proporciona señales medibles que pueden observarse en la región de 750-1050 nm cuando se produce resonancia. Por otro lado, en la región de 450-700 nm, las intensidades reflejadas medidas no varían debido a resonancia y pueden utilizarse para monitorizar fluctuaciones debidas a efectos ajenos, es decir artefactos, tales como: variaciones en la temperatura; inestabilidades de la fuente de luz; inestabilidades del flujo de líquido sobre la superficie de sensor; choques; etc.

Por tanto, una monitorización continuada o regular de esta región sin excitación de SPR del espectro puede utilizarse para detectar una variación puntual o instantánea o una deriva de la señal, y también puede utilizarse para corregir la señal medida de la luz reflejada en el rango de resonancia, tal como se explicará a continuación.

Aunque los espectros mostrados en la figura 2 se obtuvieron bajo iluminación con luz blanca, tal como se mencionó, ventajosamente es posible utilizar simplemente dos LED para realizar el mismo análisis: uno para excitar SPR y obtener una señal significativa alrededor de 900 nm y el otro para monitorizar las fluctuaciones alrededor de 525 nm. Esta posibilidad se ilustra en la figura 2 mediante los rectángulos indicados como LED1 y LED2 respectivamente, abarcando cada LED un ancho de banda respectivo del espectro. Por tanto, LED1 emite el haz de luz de prueba incidente mientras que LED2 emite el haz de luz de referencia incidente.

Aunque no se utiliza en el presente caso, LED1' constituye otra posibilidad para el haz de luz de prueba. De hecho, una condición de resonancia de plasmones superficiales también puede determinarse ventajosamente monitorizando la diferencia entre un pico "positivo" medido (por ejemplo a 900 nm), que aumenta a medida que cambia la condición de acoplamiento luz-SPR en la superficie de sensor, y un pico "negativo" observado (por ejemplo a 820 nm), que aumenta en sentido opuesto al pico positivo observado a medida que cambia la condición de acoplamiento luz-SPR en la superficie de sensor. La monitorización de las diferencias entre estos picos superior e inferior permite mejorar la sensibilidad del procedimiento de detección. En tal caso, es posible utilizar dos LED por condición de resonancia; en el presente caso, dos LED para la resonancia deslocalizada y dos LED para la resonancia localizada.

Se observará que la banda de LED1 y la banda de LED2 pueden estar separadas por una frecuencia intermedia (MRF), que puede corresponder a una frecuencia de resonancia máxima de SPR en la superficie de sensor.

Además, cuando se utilizan tales fuentes monocromáticas, se prefiere emplear un CCD como detector en lugar de un espectrómetro. El CCD integra toda la luz procedente de la muestra dentro del ancho de banda de los LED y normalmente integra y promedia la señal a lo largo del tiempo. Otra ventaja principal de utilizar un detector de CCD es la resolución espacial de modo que puede obtenerse un mapa de la superficie al detectar la señal localmente dependiente en la superficie de sensor; pueden realizarse por tanto ensayos multiplexados con una superficie de sensor preparada de manera apropiada.

Volviendo ahora a la figura 2, los valores representados gráficamente son indicativos de la variación en las intensidades monitorizadas del haz de luz de referencia, es decir bajo iluminación con LED2, para las mismas

muestras que en la figura 1. El eje y indica en este caso en realidad los valores promediados en frecuencia de la variación en las intensidades dentro de la banda espectral de LED2, que pueden calcularse como el área del espectro dentro del ancho de banda de LED2 dividido entre el ancho de banda. El eje x indica la variación en el índice de refracción expresada en unidades de índice de refracción (RIU). Tal como puede observarse, los valores de y aumentan hasta variaciones en el índice de refracción de 0,01 RIU y después disminuyen ligeramente. Aunque aparentemente no hubo ninguna variación sensible en este ancho de banda en la figura 1, en este caso puede observarse que se produjo fluctuación. Esto se debe posiblemente a un calentamiento del sistema y a una posterior estabilización del sistema y deja claro que es independiente del cambio en el índice de refracción sobre la superficie de sensor. La variación concuerda hasta el 1%, y particularmente para los cambios inferiores de índice de refracción cuando la señal es pequeña.

Así, como puede deducirse a partir de la figura 2, la monitorización de la intensidad reflejada de un haz de luz de control/de referencia a una longitud de onda que no excita SPR permite detectar la aparición de artefactos. Aunque, en realidad, la monitorización de la luz de referencia reflejada también permite corregir los valores obtenidos bajo la iluminación con la luz de prueba y, por tanto, mejorar la calidad y sensibilidad así como el límite de detección del procedimiento; esto se explicará ahora con referencia a la figura 3.

La figura 3 presenta dos conjuntos de puntos, estando un conjunto (a) corregido en cuanto a artefactos utilizando la monitorización de la señal de referencia y con el otro conjunto (b) sin corregir. Los puntos son valores de prueba promediados en frecuencia de las intensidades medidas del haz de luz de prueba que se han obtenido integrando las señales medidas a lo largo del ancho de banda de LED1. Sin embargo, para el conjunto de puntos corregido, el valor promediado en frecuencia correspondiente obtenido mediante integración de la luz medida bajo el LED2 de referencia se resta del valor de prueba promediado en frecuencia obtenido inicialmente. Haciendo esto se tienen en cuenta las fluctuaciones debidas a artefactos, y pueden evitarse mediciones erróneas.

Tal como puede observarse, una línea recta se ajusta mucho mejor al conjunto de puntos corregido (a) que al no corregido (b). La corrección es particularmente eficaz para las variaciones inferiores en el índice de refracción, cuando la relación señal/ruido es menor.

Tal como quedará claro para los expertos en la materia, el ajuste lineal corregido puede utilizarse entonces ventajosamente como curva de calibración para determinar el índice de refracción de una muestra.

Una forma de realización preferida del sistema de detección por SPR 50 adaptado para realizar el presente procedimiento se ilustra esquemáticamente en la figura 4. Este sistema de detección por SPR 50 está particularmente adaptado para aplicaciones de biodetección debido a la estructura de su sensor 52 que comprende ligandos u otros restos de selección como diana fijados a la superficie de detección 54. Dependiendo de los restos de selección como diana, el biosensor puede diseñarse para analizar una variedad de muestras, por ejemplo medir la concentración de moléculas químicas o bioquímicas específicas en una disolución tal como sangre, orina o agua, etc. El presente sistema de detección 50 es compacto y, por tanto, puede instalarse y transportarse fácilmente para diversas aplicaciones, por ejemplo para medir parámetros médicos cerca del paciente, para detectar y cuantificar contaminación de alimentos y agua o para detectar explosivos, contaminantes o sustancias tóxicas en la atmósfera, etc.

El biosensor 52 presenta una superficie de sensor 54 que forma la capa de detección y construida como nanorrejilla de oro periódica configurada para permitir la generación de SPR, en particular SPR localizada y deslocalizada. Tal como se sabe, la SPR localizada corresponde a ondas electromagnéticas asociadas a la superficie que están confinadas a regiones definidas en la superficie de sensor, mientras que la SPR deslocalizada corresponde a ondas electromagnéticas asociadas a la superficie que no están confinadas a esas regiones definidas en la superficie de sensor. La superficie de sensor 54 se sitúa encima de un sustrato 56 transparente que puede transmitir luz para permitir el funcionamiento en modo de reflexión desde la cara trasera 58 del sensor.

En la técnica se conocen diversos procedimientos posibles de fabricación de un sensor 52 de este tipo. En una forma de realización, el sustrato 56 transparente consiste en un vidrio transparente o un polímero transparente, por ejemplo poliestireno transparente. La capa de superficie de sensor 54 se fabrica preferentemente depositando una capa de poli(ácido acrílico) (ppAA) sobre un sustrato 56 de vidrio y una capa posterior de perlas de poliestireno (PS). Las capas de ppAA y PS se atacan químicamente con plasma de O₂ para formar una estructura de rejilla que comprende pilares distanciados uniformemente de ppAA separados por una distancia submicrométrica. Después se deposita oro sobre los pilares para rellenar los huecos entre pilares contiguos, y se retira el resto de la máscara de PS, obteniéndose una nanorrejilla de oro periódica. Otros posibles materiales para los pilares dieléctricos son poliestireno o poli(metacrilato de metilo), etc. En lugar de un sustrato de vidrio, es posible utilizar un sustrato polimérico, por ejemplo compuesto por PS o PMMA u otro material transparente, que permita dirigir el ataque químico del sustrato para formar los pilares.

Se entenderá que las propiedades geométricas y físicas de la estructura con patrón de la superficie de sensor determinan las condiciones de resonancia de plasmones superficiales (acoplamiento de resonancia) en la superficie

de sensor, en particular las frecuencias de los plasmones superficiales y una frecuencia de excitación de SPR máxima, y por tanto determinan el efecto óptico de la excitación de SPR en la superficie de sensor.

El símbolo de referencia 58 indica una capa muy delgada de material antiincrustante, por ejemplo de hidrogel antiincrustante, concretamente polietilenglicol. Tal como se sabe, el material antiincrustante actúa de manera antiadhesiva para impedir o reducir interacciones no deseadas, tales como la absorción no específica de moléculas químicas o bioquímicas etc. en la superficie de sensor. Esto reduce las señales de ruido que podrían haberse provocado por la interacción o la unión de moléculas químicas o bioquímicas no deseadas en la superficie de sensor.

Encima de esta capa antiincrustante 58 hay una microrred 60 de restos de selección como diana, es decir ligando o moléculas fijadas de manera organizada a la capa antiincrustante que se unirán a o inmobilizarán biomoléculas específicas u otros analitos de interés en la muestra líquida en contacto con la superficie de sensor. Estos restos de diana pueden comprender antígenos/anticuerpos, enzimas, proteínas, oligonucleótidos etc. Los restos de selección como diana pueden fijarse fácilmente a la capa antiincrustante mediante impresión por contacto (en inglés, *microspotting*) que permite una amplia variedad de configuraciones de la red, variando el tamaño de las impresiones y las clases de restos de selección como diana. Tal técnica de impresión por contacto se describe, por ejemplo, en el artículo "*Fabrication and characterization of protein arrays for stem cell patterning*" de Laura Ceriotti *et al.*, publicado en *Soft Matter* 2009, 5, 1-12.

Haciendo referencia ahora, de manera más general, a la configuración óptica del sistema de SPR 50, éste comprende una fuente de haz de luz de prueba 62 y una fuente de haz de luz de referencia 64. La fuente de haz de luz de prueba 62 y la fuente de haz de luz de referencia 64 comprenden preferentemente, cada una, un diodo emisor de luz (LED) o un láser. La fuente de haz de luz de prueba 62 está configurada para emitir un haz de luz de prueba 62a que presenta una o más frecuencias correspondientes a una o más frecuencias admitidas de SPR en la superficie de sensor 10 para excitar resonancia. Preferentemente, la fuente de haz de luz de prueba 62 está configurado para emitir un haz de luz de prueba 62a en por lo menos una banda de emisión espectral que abarca por lo menos una banda espectral admitida de SPR en la superficie de sensor 54, de manera similar a LED1 en la figura 1.

En cambio, la fuente de haz de luz de referencia 64 está configurada para emitir un haz de luz de referencia 64a de una o más frecuencias que no corresponden a frecuencias admitidas de SPR en la superficie de sensor 54 para no excitar SPR. Preferentemente, la fuente de haz de luz de referencia 64 está configurada para emitir un haz de luz de referencia 64a en por lo menos una banda de emisión espectral distante con respecto a las frecuencias admitidas de SPR en la superficie de sensor 54. Por ejemplo, la fuente de haz de luz de referencia 64 puede estar configurada para emitir luz de referencia que abarca una banda espectral cuyos límites espectrales se encuentran en una posición espectral alejada por lo menos el doble de la anchura a mitad de altura (FWHM) de la resonancia de plasmones superficiales del pico de resonancia de plasmones superficiales.

Cuando hay más de un pico de SPR (como, por ejemplo, en el caso de que haya picos localizados y deslocalizados), la distancia entre el pico de resonancia y el haz de referencia se calcula del pico de SPR más próximo. Asimismo, es posible considerar la selección del haz de referencia alejado por lo menos de 2 a 4 veces el pico de SPR más próximo.

Se apreciará que, al operar en tal posición espectral, es posible que el haz de referencia evite toda excitación de resonancia de plasmones superficiales.

De manera convencional en pruebas de SPR, el principio es poder detectar pequeños cambios en el índice de refracción. Y en este caso, esto significa detectar cambios relativos al índice de refracción del medio que contiene las biomoléculas u otros agentes que van a detectarse.

Sin embargo, debe recordarse que, tal como se explicó anteriormente, la posición espectral de las resonancias de plasmones superficiales (localizada y deslocalizada) viene determinada de manera única por la estructura de la nanorrejilla y el índice de refracción del medio que contiene las biomoléculas u otros agentes que van a detectarse.

Cuando se produce el reconocimiento en la superficie de sensor, la SPR se desplazará en el espectro una cantidad que está comprendida entre el límite de detección del sistema (desplazamiento espectral mínimo detectable) y la FWHM de cada resonancia de plasmones superficiales.

Por tanto, seleccionar un haz de referencia con una banda espectral distante con respecto a la SPR y concretamente con su extremo de ancho de banda más próximo por lo menos al doble de la FWHM del pico de SPR, evita excitar los plasmones superficiales en el pico de SPR monitorizado por lo demás a través del haz de prueba.

Haciendo referencia ahora más específicamente a la presente variante con una superficie de sensor con SPR de superficie nanoestructurada, es posible observar que la posición espectral de la estructura de resonancia utilizada

como sonda sensible depende de los parámetros estructurales de la superficie nanoestructurada y, en particular, del tamaño y la forma de los pilares poliméricos. De hecho, la resonancia corresponde a un modo de oscilación de carga que presenta el campo eléctrico máximo dentro del área superficial del pilar y cerca de su parte superior. En este caso, esto se debe a la peculiar forma de cono truncado del pilar y al correspondiente borde circular delgado formado por oro situado encima.

El efecto de una conformación de este tipo es doble:

- el campo eléctrico se localiza y potencia justo encima del pilar; es decir, donde la probabilidad de fijación de las moléculas de analito es la mayor;
- la forma cónica y el índice de refracción del sustrato que permiten que este modo plasmónico se acople fácilmente con oscilaciones plasmónicas de oro sobre la cara del sustrato, hace que tal potenciación de campo sea particularmente eficaz cuando se excita desde la cara trasera.

A una distancia espectral suficiente con respecto a este tipo de resonancia (el doble de su FWHM es una buena separación) se pierde la alta sensibilidad relacionada con una configuración de campo tan peculiar porque: o bien cambia la distribución espacial del campo eléctrico, con sus valores máximos en diferentes lugares en ambas superficies (delantera o trasera) o en el interior del pilar (donde no pueden detectarse moléculas de analito); o bien no se permite una coincidencia de los modos a través de los pilares, por lo que la excitación de un campo potenciado no se transmite a la región sensible.

Por consiguiente, al seleccionar un haz de referencia ubicado dos veces a la FWHM del pico de SPR que está monitorizándose, es posible observar propiedades ópticas de la superficie de sensor que, intencionadamente, no están relacionadas con ninguna resonancia de plasmones soportada por la superficie.

Aunque se utiliza en el presente caso porque la investigación se realiza con un ángulo de incidencia fijo, es posible variar el ángulo de incidencia del haz de referencia para iluminar la muestra en condiciones que no motivan SPR.

Tal como puede observarse en la figura 4, el haz de luz de prueba 62a y el haz de luz de referencia 64a se dirigen hacia la superficie de sensor 54 por medio de una configuración óptica, que puede comprender, por ejemplo, un acoplador 66 óptico, un divisor 68 de haz y un sistema de lentes 70. El acoplador 66 óptico está configurado para controlar la transmisión alterna o simultánea del haz de luz de prueba 62a y el haz de luz de referencia 64a hacia la superficie de sensor 54. El sistema de lentes 70 se utiliza para transmitir los haces de luz de prueba y/o de referencia 62a, 64a para iluminar de manera homogénea la superficie de sensor 54. Se observará que el haz de luz de prueba 62a y/o el haz de luz de referencia 64a pueden iluminar la superficie de sensor 10 con diversos ángulos de incidencia, aunque en la presente configuración el ángulo de incidencia es fijo. Debido a esta configuración, ambos haces de luz de referencia y de prueba llegan con el mismo ángulo de incidencia fijo a la capa de detección.

Tal como puede verse a partir de la figura 4, los haces de luz de prueba y de referencia 62a, 64a se dirigen hacia la superficie de sensor 54 a través del sustrato 56 transparente, donde se reflejan sobre la cara de la superficie de sensor 54 que entra en contacto con el sustrato 56 transparente. Se observará que la luz reflejada sobre esta cara interna de la superficie de sensor 52 no interfiere con ni se dispersa en la muestra situada sobre la microrred. La reflexión interna, es decir desde la cara trasera 58, es por tanto ventajosa porque evita cualquier interferencia de transmisión de luz debida a la muestra y a la estructura de microrred. Los haces de luz reflejados sobre la superficie de sensor se dirigen entonces por medio del divisor 68 de haz a un fotosensor 72. El fotosensor 72 está adaptado para medir la intensidad o una cantidad indicativa de la misma, tal como las intensidades espectrales, la absorbancia, la reflectancia, la reflectividad, etc. Se observará que el fotosensor 72 también está adaptado para monitorizar la intensidad del haz de luz de prueba 62a, en particular de un valor promediado en tiempo o en frecuencia de la misma, en una o dos dimensiones, permitiendo de ese modo, por ejemplo, una detección simultánea de muchos cambios locales en la condición de acoplamiento luz-SPR en la superficie de sensor 54. Ventajosamente, el fotosensor 72 puede estar adaptado para proporcionar una imagen mono o bidimensional de una intensidad medida o monitorizada. Se entenderá que tal funcionamiento mono o bidimensional del fotosensor 72 permite, por ejemplo, la detección simultánea de muchas moléculas de interés diferentes que interactúan en o se unen a la superficie de sensor 54. Un fotosensor 72 de formación de imágenes de SPR mono o bidimensionales de este tipo permite el análisis de alto rendimiento de eventos químicos o bioquímicos en la superficie de sensor 54 y también permite reducir el coste por ensayo promedio del sistema de detección.

En una forma de realización preferida, el fotosensor 72 comprende preferentemente una cámara con resolución temporal y/o espectral basada en un dispositivo acoplado por carga (CCD) o en una red de fotodiodos para medir la intensidad del haz de luz de prueba 62a y para detectar cambios en la intensidad del haz de la luz de referencia reflejado 64a. Preferentemente, esta cámara está adaptada para resolver una señal medida a lo largo de intervalos de tiempo cortos, que se encuentran normalmente en el rango de los milisegundos. Más preferentemente, esta cámara también puede emitir señales indicativas de mediciones sucesivas de intensidades promediadas en tiempo y/o en frecuencia del haz de luz de prueba 62a y/o del haz de luz de referencia 64a. La cámara también puede estar adaptada para medir las intensidades espectrales del haz de luz de prueba reflejado 62a y para emitir una señal

indicativa de una intensidad espectral promedio medida, es decir indicativa de un valor medio de intensidades espectrales medidas, o cualquier señal indicativa del mismo.

5 Las señales correspondientes a las intensidades monitorizadas de los haces de luz de referencia y las señales correspondientes a las intensidades medidas del haz de luz de prueba se transmiten entonces a un procesador 74. Ventajosamente, el procesador 74 permite detectar la aparición de excitación de SPR detectando una reducción gradual en la intensidad reflejada medida de la luz de prueba, y en particular detectando una caída en el espectro de la intensidad medida del haz de luz de prueba reflejado 62a provocada por la absorción de luz en la superficie de sensor 542. Se entenderá que una intensidad medida del haz de luz de prueba 62a también puede ser indicativa de
10 una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida del haz de luz de prueba o de un cambio en la misma.

Además, el fotosensor 72 está adaptado para detectar un cambio en la intensidad reflejada monitorizada del haz de luz de referencia 64a, en particular un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, monitorizada, un cambio en una intensidad espectral monitorizada, un cambio en la absorbancia monitorizada, un cambio en la reflectancia o reflectividad monitorizada, etc., del haz de luz de referencia 64a según se refleja por la superficie de sensor 52 para determinar así la aparición de un artefacto.
15

El procesador 74 está configurado para procesar, en particular filtrar, las mediciones del fotosensor 72. Este procesador 74 está programado preferentemente para corregir las intensidades medidas del haz de luz de prueba 62a de la manera descrita anteriormente en el presente documento y para estimar un cambio en el índice de refracción en la superficie de sensor de la manera descrita anteriormente.
20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección por SPR, que comprende las etapas siguientes:

- 5 proporcionar un sensor de SPR que comprende una superficie de sensor que soporta SPR;
- poner una muestra que va a analizarse en contacto con dicha superficie de sensor y monitorizar por lo menos una condición de resonancia en dicha superficie de sensor que soporta SPR iluminando dicha superficie de sensor con un haz de luz de prueba que excita SPR y detectando el haz de luz de prueba reflejado o transmitido;
- 10 determinar por lo menos una propiedad de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido;
- caracterizado por que comprende
- 15 iluminar dicha superficie de sensor con un haz de luz de referencia en condiciones seleccionadas para no excitar SPR en dicha superficie de sensor y detectar la intensidad del haz de luz de referencia reflejado o transmitido;
- en el que la determinación de dicha por lo menos una propiedad de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido tiene en cuenta la intensidad detectada del haz de luz de referencia reflejado o transmitido.
- 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha por lo menos una propiedad de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido se filtra o se corrige basándose en dicha intensidad detectada del haz de luz de referencia reflejado o transmitido.
- 25
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que se determina un valor de deriva indicativo de una desviación de dicha intensidad detectada de dicho haz de luz de referencia con respecto a datos de referencia, y dicho valor de deriva se utiliza en la determinación de dicha por lo menos una propiedad de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido.
- 30
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dichos datos de referencia son indicativos de una intensidad previamente monitorizada de dicho por lo menos un haz de luz de referencia y dicho valor de deriva es indicativo de una desviación de dicha intensidad monitorizada con respecto a dicha intensidad previamente monitorizada.
- 35
5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, en el que dicho valor de deriva se utiliza para concluir la aparición de un artefacto de dicha propiedad medida de la luz, y en el que dicha propiedad medida de la luz se examina en cuanto a si es correcta o incorrecta basándose en la aparición de un artefacto.
- 40
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la propiedad medida de la luz de por lo menos un haz de luz de prueba es una intensidad medida, en particular una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida o un cambio en una intensidad medida, en particular un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida de dicho por lo menos un haz de luz de prueba.
- 45
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado por que utiliza dicho valor de deriva para corregir una intensidad medida, en particular una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida, o un cambio en una intensidad medida, en particular un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida de dicho por lo menos un haz de luz de prueba reflejado o transmitido.
- 50
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho valor de deriva es indicativo de una amplitud de variación de dicho haz de luz de referencia reflejado o transmitido y dicha por lo menos una propiedad de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido es un valor de intensidad obtenido restando dicho valor de deriva del valor de intensidad medido de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido.
- 55
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha superficie de sensor comprende una nanorrejilla periódica de un metal noble.
- 60
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se fijan restos de selección como diana sobre dicha superficie de sensor, los cuales presentan especificidad de unión a analitos deseados, estando organizados dichos restos de selección como diana preferentemente como una microrred.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho haz de luz de prueba y dicho haz de luz de referencia se producen, cada uno, mediante una respectiva fuente de luz monocromática.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que cada condición de resonancia se monitoriza utilizando por lo menos dos haces de luz de prueba centrados sobre unas respectivas posiciones espectrales que motivan SPR.
- 5 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho haz de luz de referencia emite luz de referencia que abarca una banda espectral, cuyos límites espectrales se encuentran en una posición espectral alejada por lo menos el doble de la anchura a media altura de la resonancia de plasmones superficiales del pico de resonancia de plasmones superficiales.
- 10 14. Sistema de detección por SPR, que comprende:
- un sensor de SPR que comprende una superficie de sensor que soporta SPR;
- 15 por lo menos una fuente de luz de prueba que emite por lo menos un haz de luz de prueba para iluminar la superficie de sensor en condiciones seleccionadas para excitar SPR en la superficie de sensor,
- un fotosensor para medir una propiedad de la luz de dicho por lo menos un haz de luz de prueba según se transmite o se refleja por la superficie de sensor para monitorizar una condición de resonancia en la superficie de sensor,
- 20 caracterizado por que comprende
- por lo menos una fuente de luz de referencia que emite por lo menos un haz de luz de referencia para iluminar la muestra en condiciones seleccionadas para no excitar la resonancia de plasmones superficiales en dicha superficie de sensor, en el que dicho fotosensor también está adaptado para monitorizar una intensidad de por lo menos un haz de luz de referencia según se transmite o se refleja por dicha superficie de sensor; y
- 25 unos medios de procesador configurados para determinar por lo menos una propiedad de dicho haz de luz de prueba reflejado o transmitido teniendo en cuenta la intensidad detectada del haz de luz de referencia reflejado o transmitido.
- 30 15. Sistema de detección por SPR según la reivindicación 14, caracterizado por que dicho haz de luz de referencia emite luz de referencia que abarca una banda espectral, cuyos límites espectrales se encuentran en una posición espectral alejada por lo menos el doble de la anchura a media altura de la resonancia de plasmones superficiales del pico de resonancia de plasmones superficiales.
- 35 16. Sistema de detección por SPR según la reivindicación 14 o 15, caracterizado por que el fotosensor está adaptado para medir una intensidad, en particular una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, o un cambio en la intensidad, en particular un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, de por lo menos un haz de luz de prueba según se transmite o se refleja por la superficie de sensor.
- 40 17. Sistema de detección por SPR según la reivindicación 14, 15 o 16, caracterizado por que el fotosensor está adaptado para monitorizar una intensidad, preferentemente una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, de dicho por lo menos un haz de luz de referencia según se refleja o se transmite por la superficie de sensor, y por que dicho procesador está configurado para utilizar un valor de deriva para corregir la intensidad medida, la intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida o un cambio en la misma.
- 45 18. Sistema de detección por SPR según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizado por que los medios de procesador están conectados operativamente a unos medios de almacenamiento para almacenar o leer datos de calibración, estando los medios de procesador adaptados para estimar un cambio en el índice de refracción en la superficie de sensor comparando los datos de calibración con un cambio en una intensidad medida, en particular con un cambio en una intensidad promedio, ponderada en tiempo o en frecuencia, medida de dicho por lo menos un haz de luz de prueba.
- 50 19. Sistema de detección por SPR según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, caracterizado por que dicha por lo menos una fuente de haz de luz de prueba es una fuente de luz monocromática que emite a una o más frecuencias que coinciden con una o más frecuencias de SPR en la superficie de sensor para excitar SPR, y por que dicha por lo menos una fuente de haz de luz de referencia es una fuente de luz monocromática configurada para emitir a una o más frecuencias que no coinciden con una o más frecuencias de SPR en la superficie de sensor para no excitar SPR.
- 55 60

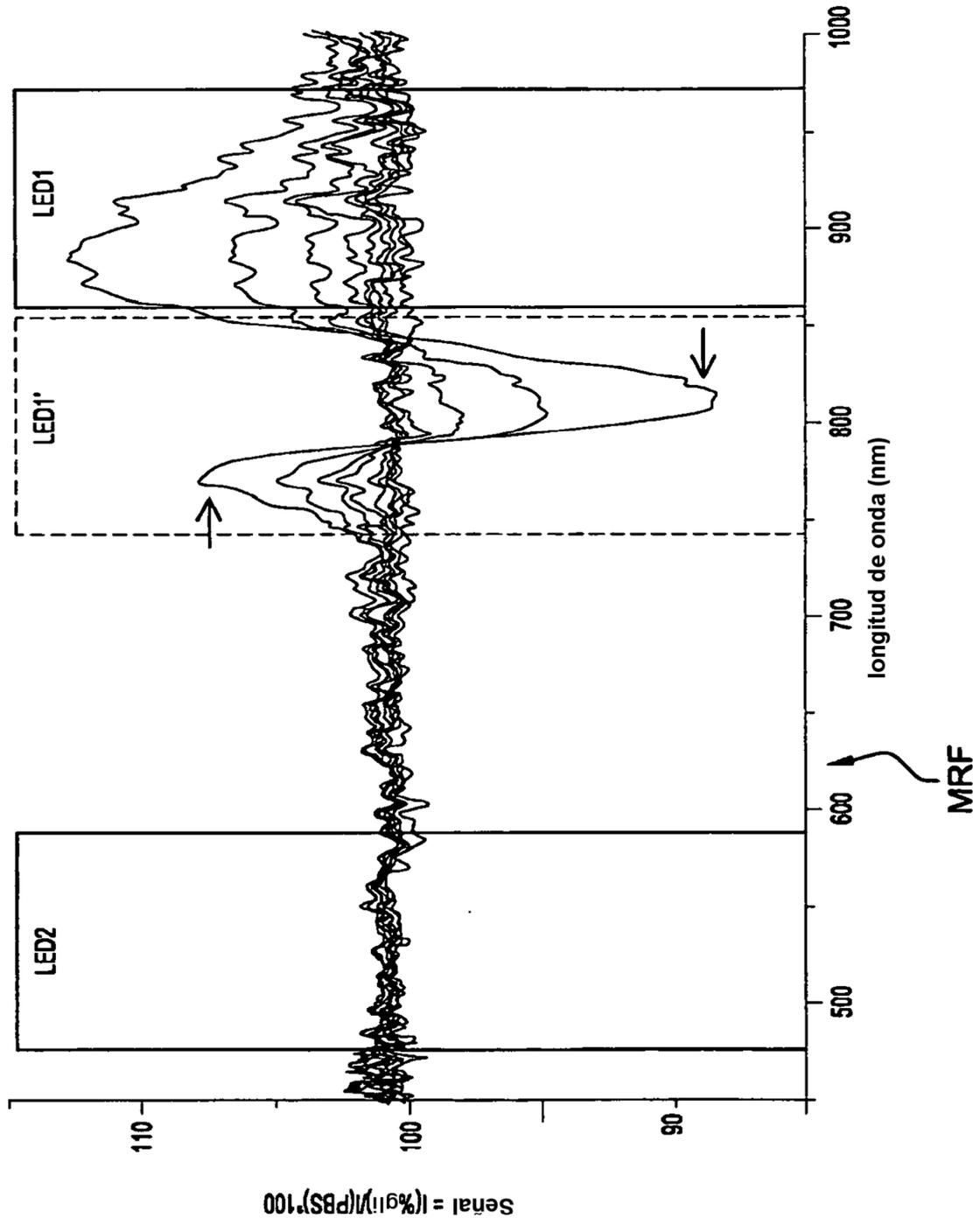


Fig. 1

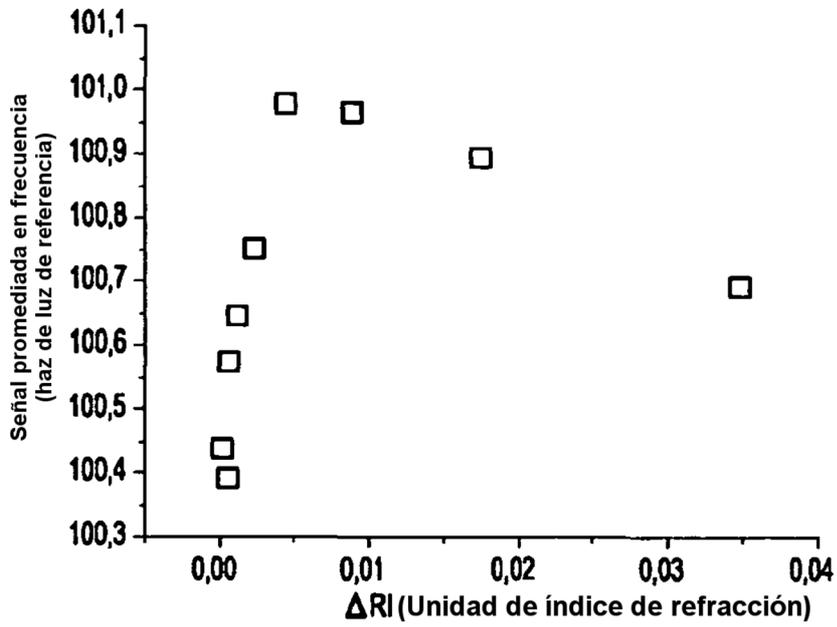


Fig. 2

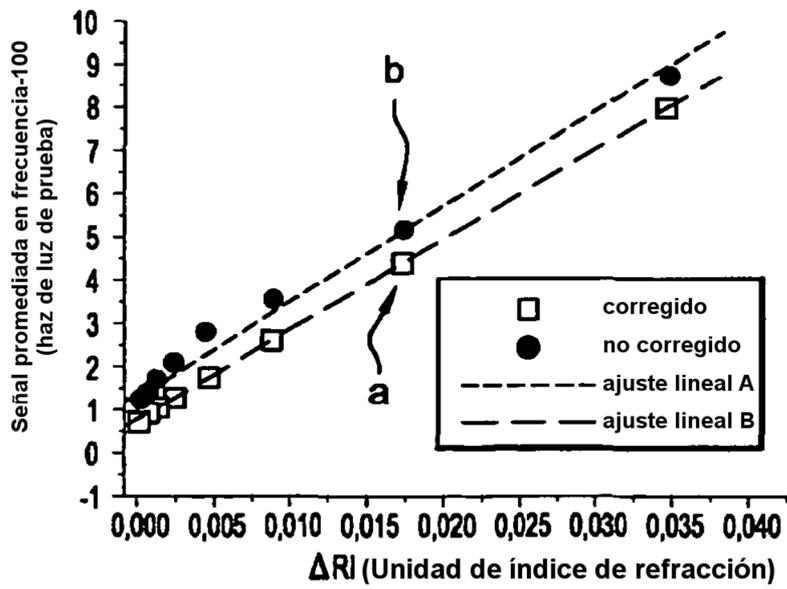


Fig. 3

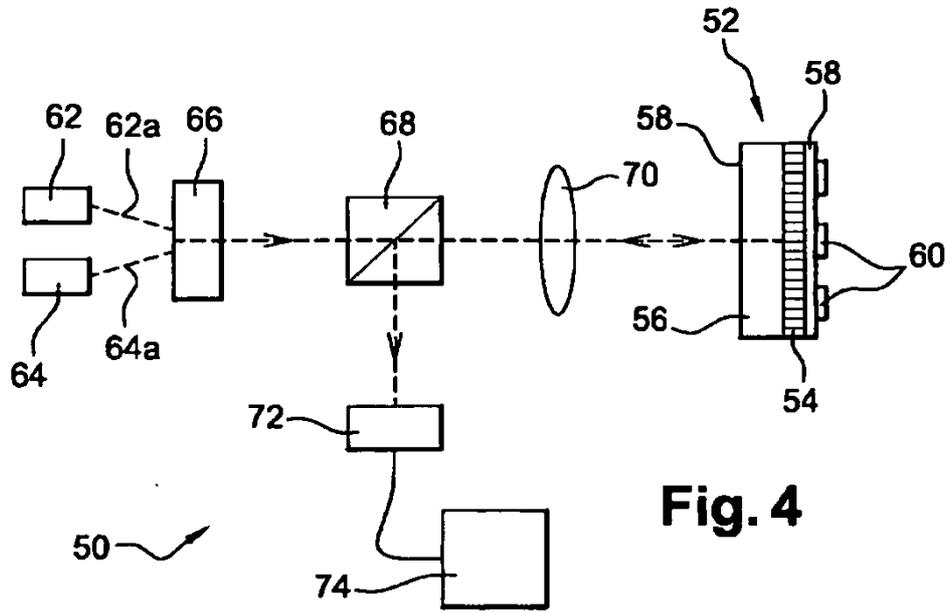


Fig. 4

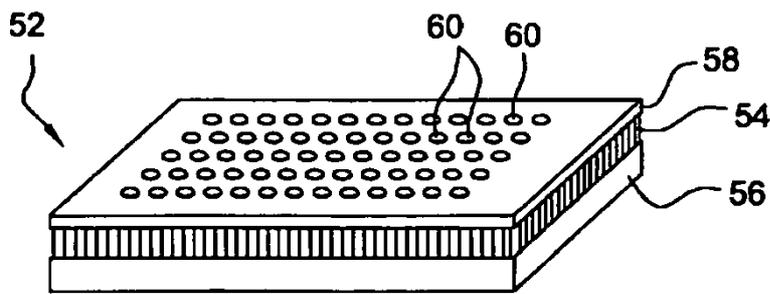


Fig. 5